

一ノ瀬亨 論文（テーシス）内容の要旨

主 論 文 (テーシス)

ベータノダウイルスの宿主域・感染機構の解析及び Oligonol の抗ベータノダウイルス効果の評価

一ノ瀬 亨

長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科 新興感染症病態制御学系専攻
(主任指導教員：小林 信之 教授)

[諸言]

ノダウイルス科は昆虫を主として自然宿主とするアルファ属と海産魚を主として自然宿主とするベータ属に分類されている。ノダウイルスはプラス鎖の一本鎖 RNA を遺伝子としてもち、現在までヒトでの感染は報告されていないが豚への感染が知られているため、2006 年まで HIV 等と同等の BSL3 に指定されていた。多くの節足動物媒介 RNA ウイルスがヒトに重篤な感染症を引き起こすことからノダウイルスのヒトへの感染の可能性を含め、その感染様式の解明が急務とされてきた。申請者らを含めたこれまでの研究からノダウイルスはヒトに感染可能であるがその複製酵素の至適温度が 28 度であり、ヒト体温 37 度では複製ができないためヒトでの複製ができないことなどが明らかにされてきた。RNA ウイルスは変異頻度が高いため複製酵素の至適温度が変わりヒトでの複製が可能になる危険性を含むため現在も BSL2 の危険度に指定されている。一方、ベータ属は、ほとんどの養殖漁場で高頻度に蔓延し、感染魚に致死率の高いウイルス性神経壊死症を引き起こすことで問題となっている。しかしながらワクチンはウイルス感染が稚魚の段階で起こるため開発が困難とされている。本研究はこれまで申請者らが行ってきたノダウイルス感染機構の解明研究の知見をもとに抗ベータノダウイルス剤の探索を目的とした。

[対象と方法]

宿主域の解析

魚類由来細胞 (E-11)、ヒト由来細胞株 (HeLa, A549, 293T) 及び哺乳動物由来細胞株 (DBT 等) にベータノダウイルスを 100 TCID₅₀/cell で感染後、ウイルス増殖至適温度 (28°C) での各細胞株における子孫ウイルス産生等を検出した。また、各細胞株へのウイルス吸着性について検討した。さらに、細胞にウイルスゲノム RNA を導入後、ウイルスコート蛋白質発現、子孫ウイルス産生を検出した。

感染機構の解析

各種エンドサイトーシス阻害剤 (塩化アンモニウム、クロロキン、バフィロマイシン A1、ゲニステイン、クロルプロマジン) 処理 E-11 細胞に対しウイルスを 1 TCID₅₀/cell で感染させ、細胞へのウイルス吸着、CPE 発現、子孫ウイルス産生、ウイルスゲノム複製を検出した。

抗ベータノダウイルス剤の探索

低毒性かつ高い生理活性が期待できる物質としてポリフェノールに着目し、低分子ポリフェノールの混合物である Oligonol の抗ウイルス効果について評価した。

2倍段階希釈した Oligonol (0.63–40 µg/mL) で処理した E-11 細胞にウイルスを感染させ、CPE 発現、子孫ウイルス産生、ウイルスコート蛋白質発現を解析した。また、細胞生存率から Oligonol の EC₅₀、CC₅₀、および Selectivity index (SI) を算出した。さらに、Oligonol の細胞へのウイルス吸着阻害効果について検討した。

[結果]

- (1) 複数の哺乳動物由来細胞株で 28 度でノダウイルスの感染が確認された。マウス astrocytoma 由来 DBT では特に高いウイルス増殖性を示した。
- (2) 28 度におけるヒト由来細胞株におけるウイルス感染では、ウイルス吸着は検出されたが、ウイルスの増殖は認められなかった。
- (3) ウイルス RNA 導入ヒト由来細胞株では、子孫ウイルス産生が検出された。
- (4) エンドサイトーシス阻害剤処理 E-11 細胞ではウイルス感染が阻害された。
- (5) Oligonol 処理 E-11 細胞において、細胞へのウイルス吸着阻害効果が見られ、ウイルス増殖が Oligonol 濃度依存的に抑制された。CC₅₀ は 27.0 µg/mL、EC₅₀ は 0.87–1.81 µg/mL、SI は 15.0–31.1 となり、感染時のウイルス量に依存的であった。

[考察]

ベータノダウイルスは哺乳動物由来細胞株でも増殖可能であることが明らかとなった。ヒト由来細胞株においては、ウイルスは吸着するものの感染は成立しなかったが、ウイルス遺伝子導入ではウイルス産生が見られた。その理由は主としてウイルス複製酵素の至適温度が 30 度以下であるためと考えられる。ウイルス遺伝子変異等により複製酵素の至適温度が 37 度付近に変化した場合ノダウイルスはヒトでも増殖可能であると考えられる。

ベータノダウイルスの細胞内侵入機構として液胞型 H⁺-ATPase 依存的かつクラスリン依存的エンドサイトーシス機構の可能性が示唆され、エンドサイトーシス阻害剤が抗ベータノダウイルス剤として利用できる可能性が示されたが強い毒性のために使用に難があると考えられた。Oligonol は低い細胞毒性でベータノダウイルスの吸着阻害活性をもち結果としてウイルスの感染を防御することが明らかとなった。Oligonol が抗ベータノダウイルス剤として有用であり、ベータノダウイルスの感染拡大防止へと貢献することが期待できる。さらにウイルス変異によりヒトへの感染性を確保した場合にも、ヒトへ適応できる可能性があると考えられる。

[基礎となった学術論文]

Ichinose T, Musyoka TM (equal contribution), Watanabe K, Kobayashi N. Evaluation of antiviral activity of Oligonol, an extract of *Litchi chinensis*, against betanodavirus. *Drug Discov Ther.* 7: 254-260 (2013)

[参考論文]

1. Adachi K, **Ichinose T**, Watanabe K, Kitazato K, Kobayashi N. Potential for the replication of the betanodavirus redspotted grouper nervous necrosis virus in human cell lines. *Arch Virol.* 153: 15-24 (2008)
2. Takizawa N, Adachi K, **Ichinose T**, Kobayashi N. Efficient propagation of betanodavirus in a murine astrocytoma cell line. *Virus Res.* 136: 206-210 (2008)
3. Adachi K, **Ichinose T**, Takizawa N, Watanabe K, Kitazato K, Kobayashi N. Inhibition of betanodavirus infection by inhibitors of endosomal acidification. *Arch Virol.* 152: 2217-2224 (2007)